

[10] 中华人民共和国专利局

[11] 审定号 CN 1006198B



[12] 发明专利申请审定说明书

[21] 申请号 86101708

[51] Int.Cl^{*}

A61K 39/395

[44] 审定公告日 1989年12月27日

[22] 申请日 86.2.18

[30] 优先权

[32] 85.2.21 [33] JP [31] 33335/85

[71] 申请人 株式会社绿十字

地 址 日本大阪府大阪市

[72] 发明人 平尾丰 瓜生胜宽 上村八寻

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

代理部

代理人 唐 跃 穆德骏

说明书页数: 附图页数:

[54] 发明名称 γ -球蛋白的病毒灭活热处理方法

[57] 摘要

当处理添加有单糖、双糖或糖醇等至少一种稳定剂的 γ -球蛋白水溶液时, 这种溶液可以经受消毒热处理而不失去其活性。稳定剂有在进行处理之前减少有害多聚体或 γ -球蛋白的抗补体活性, 却保留抗各种病毒和细菌的多种抗体的滴定度的作用, 而可能含有的病毒的传染性则完全被消除。

将中性氨基酸、无性无机盐、有机羧酸盐或表面活性剂等另一种稳定剂和上述稳定剂一起使用有助于稳定剂的作用。

权 利 要 求 书

1. γ -球蛋白水溶液的病毒灭活热处理方法, 包括: 从单糖、双糖和糖醇中选出至少一种作为稳定剂加到 γ -球蛋白水溶液中, 加入的量要能使其中的 γ -球蛋白稳定, 该水溶液中还加入至少一种有效量的辅助稳定剂, 并且在 $50^{\circ}\text{C}-70^{\circ}\text{C}$ 温度下将水溶液加热足够长的时间, 以消除病毒的传染性, 其特征在于: 所说的辅助稳定剂是一种表面活性剂, 它的用量相当于在每百毫升 γ -球蛋白水溶液中加入 $0.002-0.05$ 克表面活性剂。

2. 根据权利要求1的方法, 其中 γ -球蛋白水溶液含有按蛋白质计为 $0.1-30\%$ (w/v) 的 γ -球蛋白。

3. 根据权利要求1的方法, 其中 γ -球蛋白水溶液的 pH 值为 $4.5-10$ 。

4. 根据权利要求1的方法, 其中稳定剂的量为每 100 毫升 γ -球蛋白水溶液 $10-100$ 克。

5. 根据权利要求4的方法, 其中稳定剂量为 100 毫升该溶液 $40-100$ 克。

6. γ -球蛋白水溶液的病毒灭活热处理方法, 包括: 从单糖、双糖和糖醇中选出至少一种作为为稳定剂加到 γ -球蛋白水溶液中, 加入的量要能使其中的 γ -球蛋白稳定, 该水溶液中还加入至少一种有效量的辅助稳定剂, 并且在 $50^{\circ}\text{C}-70^{\circ}\text{C}$ 温度下将水溶液加热足够长的时间, 以消除病毒的传染性, 其特征在于: 所说的辅助稳定剂是氯化钠, 其用量相当于在每百毫升 γ -球蛋白水溶液中加入 $0.1-10$ 克氯化钠。

7. 根据权利要求6的方法, 其中 γ -球蛋白水溶液含有按蛋白

质计为0.1—30% (w/v) 的 γ -球蛋白。

8. 根据权利要求6的方法, 其中 γ -球蛋白水溶液的pH值为4.5—10。

9. 根据权利要求6的方法, 其中稳定剂的量为每100毫升 γ -球蛋白水溶液10—100克。

10. 根据权利要求9的方法, 其中稳定剂的量为100毫升该溶液40—100克。

γ-球蛋白的病毒灭活热处理方法

本项发明是关于含有γ-球蛋白的水溶液的一种热处理方法。更确切地说，是本发明是关于γ-球蛋白的一种稳定的热处理方法。在此方法中，将某种选定的稳定剂加到γ-球蛋白的水溶液里，在低温巴斯德消毒后，也就是在60℃进行10小时处理后，并未观察到γ-球蛋白二聚体或多聚体的增加，也未观察到抗补体活性的提高。

各种含有血浆蛋白质组分的免疫球蛋白，特别是含有IgG作为主要成分的γ-球蛋白制剂已广泛用于预防和治疗各种传染性疾病。然而，它们并未经受热灭菌，原因是(1)它们的热稳定性很差；(2)它们含有对各种病毒和细菌的多种抗体，而这些抗体的活性很容易失去。

然而，当从血浆蛋白质组分制备γ-球蛋白时，不可能完全消除病毒（例如肝炎病毒）污染的可能性。因此，使γ-球蛋白制剂预先在60℃经受10小时的热处理是很重要的。这种处理在血液组分制备技术中，已被广泛认为是使污染病毒失活的一种方法。

然而，当在一种常规的水溶液，如生理盐水中进行这种处理时，该溶液在短时间里变得混浊，大部分活性丧失，蛋白质分子发生变性。

经广泛研究之后，发明者发现，在为使肝炎病毒失活而进行热处理时，若从单糖、双糖和糖醇中选出至少一种（在下文通常称之为基本稳定剂），加到含有γ-球蛋白的水溶液中，则γ-球蛋白抗热处理的热稳定性得到显著改善。还发现，当除了所说的基本稳定剂外，还将从中性氨基酸、中性无机酸盐、表面活性剂以及有机羧酸盐中选出的至少一种物质（在下文通常称之为辅助稳定剂）加到该溶液中时，γ-球蛋白

6

的热稳定性进一步提高。本发明是在上述发现的基础上完成的。

此外，按照本发明方法进行热处理，可以将 γ -球蛋白水溶液中所含的 γ -球蛋白的二聚体或多聚体解离为它的单体。

在根据本发明进行热处理前，含 γ -球蛋白的水溶液可以是处于从未纯化的含 γ -球蛋白的水溶液到已纯化水溶液之间的任何纯化阶段的 γ -球蛋白水溶液。不过，处于部分纯化或纯化阶段的水溶液接受热处理较为有利。该水溶液最好含有0.1~30%（重量/体积）的蛋白质（ γ -球蛋白）。该水溶液的pH值一般是4.5~10，最好用一适宜的缓冲溶液调节到pH 6到8。

至于加到含有 γ -球蛋白水溶液中的基本稳定剂，单糖中较好的例子包括葡萄糖、甘露糖、半乳糖和果糖，双糖中较好的例子包括蔗糖、麦芽糖和乳糖，而糖醇中较好的例子包括甘露糖醇、山梨糖醇和木糖醇，但它们并不限于这些例子。基本稳定剂的加入量为每100毫升 γ -球蛋白水溶液10—100克，最好是40—100克。

本项发明所使用的辅助稳定剂中，中性无机酸盐包括，举例来说，碱金属或碱土金属卤化物如氯化钠、氯化钾和氯化镁。它们的加入量为每100毫升 γ -球蛋白水溶液0.1—10克。

中性氨基酸（即单一氨基单一羧基的氨基酸）的例子包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。它们的加入量是每100毫升 γ -球蛋白水溶液1—20克。

在本发明中所涉及的有机羧酸是一种包含一个烃基和一个与烃基相连的羧基取代基的化合物。烃基可以是饱和的，也可以是不饱和的，可以是链状的（直链或支链），也可以是环状的。烃基的例子包括烷基和芳基（例如苯基）。在上述有机羧酸中羧基可以有多个，但最好是一个或两个。另外，上述有机羧酸可以带一个羟基。有机酸最好有约3到约15个碳原子。

7

有机羧酸的盐的种类没有特殊限制，只要它在生理上是可接受的。这种盐的较好的例子包括碱金属盐，例如钠盐和钾盐，以及碱土金属盐，例如钙盐。特别好的是钠盐和钾盐。有机酸盐的具体例子尤其包括下列酸的碱金属盐（钠或钾盐）：丙酸、丁酸、戊酸、辛酸、己酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸、己二酸和苯乙醇酸。有机酸盐的加入量是每100毫升 γ -球蛋白水溶液1—30克。

本发明中可应用的表面活性剂的例子包括非离子的表面活性剂，例如烷代苯基—聚氧乙烯，其分子量为500—1000（例如Triton（注册商标）和Nonidet（注册商标）），如胆汁酸盐等阴离子表面活性剂，例如牛磺胆酸钠，阳离子表面活性剂，例如氯苯杀克，以及具有表面活性的多元醇类，例如某种高分子量的氧化丙烯共聚物，其分子量为2000—12000（例如Pluronic（注册商标）F₆₈）它们的加入量最好是每100毫升 γ -球蛋白水溶液约0.002—约0.05克。

为了仅使污染病毒失活，热处理应该在足够高的温度下进行足够长的时间。例如，热处理在50—70℃，最好是约60℃下进行5—20小时，最好是10小时。

为了检验按照本发明进行热处理的效果，按下述方法测试了在有基本稳定剂存在和没有基本稳定剂存在的情况下进行加热对各种病毒的传染性的效果，这些病毒是人们担心在 γ -球蛋白制剂中有可能存在的。因此，将水痘病病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、水泡病毒、Chikungunya病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨基病毒或仿病毒加到 γ -球蛋白溶液样品中，所得混合物在60℃热处理10个小时，然后测定这些病毒随着时间的推移所保留下来的传染性。已发现，在10小时后，不论有无稳定剂，传染性均完全消失。该结果使人想到，当依照本发明进行热处理时，除了上面所用的那些病毒外，其它病毒也将失去它们的传染性

P

在进行有本项发明的基本稳定剂存在的上述热处理之后，检查生成的产物的外观和性质，并进一步定量测定 γ -球蛋白的二聚体或多聚体、测定抗补体活性、测定麻疹抗体的滴定度 并进行急性毒性试验。如后面的实例中所示，所得结果表明 γ -球蛋白的二聚体或多聚体及抗补体活性均有减少，但抗体滴定度仍保持着。这表明，由本发明方法可得到极为安全且在医疗上具有高效的 γ -球蛋白制剂。

这样获得的产品呈液态。视包装单位的大小，将其配制成含50—1000毫克 γ -球蛋白的单位产品。配制时，如果原来使用的是高度纯化的 γ -球蛋白作为原料，则将所得产品直接用于配制；如果产品是由一种粗产品制得的则在按已知的纯制方法进行处理，然后根据需要，进行透析或无菌过滤，再将其用于配制。其储存方法并无特别限制，只需避免高温。不过，在温度不高于30℃时储存最好，或者，愿意的话，可以制成一种冷冻干燥制品。

这样处理的 γ -球蛋白即可直接用于给药，或者，在已知的某种预备处理进行后——例如以可供针剂用的蒸馏水稀释或溶解或透析之后用于给药。对于成人，一般剂量为每次每公斤体重2500—5000毫克 γ -球蛋白，而对未成年人，为每次每公斤体重100—150毫克。

以下实例进一步说明了本发明，但本发明并不限于这些实例。

在这些实例中，由于混浊度成为一个问题，故测定吸收度——600nm处的光密度，以反映外观情况。

二聚体或多聚体的量是借助于高性能的液相色谱测定的。

按照Kabatt和Meyer的方法〔Experimental Immunology, 225(1961)〕以及Nishiohka和Okada的方法〔Meneki no Seikagaku (Biochemistry of immunity) 103, (1971); Published by Kyoritsu Shuppan

9

C0. 测定抗补体活性。也就是，将一样品加到100个单位补体内测定在所得混合液中残存的补体单位数。抗补体活性用所减少的单位表示。

麻疹抗体滴定度是根据血细胞凝集作用抑制试验测定的，并且用国际单位（IU/150 mg）表示。

实例 1

下述实验是为证实本发明的稳定效果而做的。将含有约30%的 γ -球蛋白多聚体溶液调节到5%的浓度，用如此制备的样品进行实验。样品中加入各种基本稳定剂（所加的量在表1中说明）之后，在60℃热处理样品10小时，接着，测定该溶液的混浊度（600 nm光密度）、多聚体的数量以及抗补体的活性。所获得的结果表明，由于加入稳定剂，处于加热中的 γ -球蛋白的稳定性得到了改善（表1）。

此外还证实：多聚体，特别是二聚体的量减少了。

表 1

稳 定 剂	*1 添加量	600nm 光密度	多聚体 (%)		抗补体活性 (单位)
			二聚体	多聚体	
对照组溶液(加热前)	—	0.024	33	2	54
无 (用于对比)	—	混浊	*2 —	—	—
葡萄糖	50	0.010	15	2	38
蔗糖	50	0.012	13	2	36
甘露糖醇	20	0.017	17	2	42

注: *1: 每100毫升5%(w/v)γ-球蛋白溶液中添加的克数。

*2: 多得无法测定

实例 2

按各种浓度将葡萄糖加到含有大约 20% (W/V) 多聚体的 γ -球蛋白溶液中，并且将所得混合物中的 γ -球蛋白浓度调节到 5% (W/V) 所获得的溶液在 60℃ 热处理，随着时间的推移，测定 600 nm 的光密度值、多聚体的数量、抗补体活性以及麻疹抗体的滴定度。

不含葡萄糖的体系在 1 小时内就变混浊，这表明发生了变性。含有添加的葡萄糖的体系则表现为： γ -球蛋白的稳定性随着葡萄糖加入量的增加而增加。加入 100 克葡萄糖的体系并不变混浊，甚至在 60℃ 加热 10 小时后，麻疹抗体滴定度也不见减少。此外，二聚体的含量减少到仅剩 10%，抗补体活性也减少到 19 单位（表 2）。

表 2 在 60℃ 热处理 10 小时

葡萄糖加量 (克)	600nm 光密度	多聚体 (%)		抗补体活性 (单位)	麻疹抗体滴度 (IU)
		二聚体	多聚体		
对照组溶液 (加热前)	0.024	22	3	54	42
无	混浊	—	—	—	—
5	混浊	—	—	—	—
25	0.040	15	30	>50	<10.5
50	0.010	13	3	36	21
75	0.004	12	2	28	40
100	0.004	10	2	19	40

注: *1: 多得无法测定

13

实例 3

除了基本稳定剂葡萄糖外，以中性氨基酸（甘氨酸）、中性盐（氯化钠），有机羧酸盐（柠檬酸钠）以及表面活性剂（Pluronic® F₆₈）中选出一或两种辅助稳定剂，也将它（们）加到γ-球蛋白溶液中，测定所得溶液中γ-球蛋白的对于在60℃热处理10小时的稳定性。试验是用一种和例1中所用相同，只是含约15%（W/V）的多聚体的γ-球蛋白溶液进行的。

在每100毫升的γ-球蛋白溶液内均加入75克葡萄糖，并且分别加入5.8%（W/V）的氯化钠、5%（W/V）的甘氨酸、10%（W/V）的柠檬酸钠、0.01%（W/V）的Pluronic® F₆₈，以及5.8%（W/V）氯化钠和0.01%（W/V）的Pluronic® F₆₈这两种辅助稳定剂的组合，对由此形成的各个体系都进行60℃，10小时的热处理。所得结果如表3所示。这些结果表明，多聚体的含量和抗补体活性可由于辅助稳定剂的加入而进一步降低。

表 3

辅助稳定剂 (在实例 4 中涉及到)	添加量 (克)	600nm 光密度	多聚体 (%)		抗补体活性 (单位)	麻疹抗体 滴度 (IU)
			二聚体	多聚体		
对照组溶液 (加热前)	—	0.004	15	2	44	42
无辅助稳定剂 (A)	—	0.004	8	1	28	40
氯化钠 (B)	5.8	0.004	5	1	18	42
甘氨酸 (C)	5	0.006	8	2	25	45
柠檬酸钠 (D)	10	0.004	8	1	24	38
Pluronic R F ₆₈ (D)	0.01	0.004	6	1	13	40
氯化钠	5.8					
Pluronic R F ₆₈ (F)	0.01	0.004	6	1	12	41

实例 4

急性毒性试验是根据一种安全试验的方法进行的。

将实例 3 的已经过 60℃、10 小时热处理的样品 A、B、C、D、E 和 F 均对无菌生理盐水充分透析。然后，通过尾静脉按每只动物 0.5 和 1.0 毫升的总量分别给 5 只一组的各组小鼠用药。观察 7 天后未发现反常。